SHIMADZU BIOTECH

241-08999B

G1&G2

Ampdirect® Technology

ノロウイルスG1&G2検出試薬キット

Direct RT-PCR Kit For Norovirus G1&G2 RNA Detection

For research use only

取扱説明書

Storage：–20℃　48 tests
Expiry　：6 months　P/N：241-08991-91

製品に関する注意

・本試薬キットは研究用試薬です。臨床診断の目的では使用しないでください。
・人、動物の診断・治療用ではありません。医療品、化粧品、食品など他の用途で人、動物の身体に直接使用しないでください。
・本試薬キットはノロウイルス G1（Genogroup Ⅰ）および G2（Genogroup Ⅱ）遺伝子を 1 回の反応で同時に検出（ノロウイルスの有無）することを目的とした試薬です。ノロウイルス G1 または G2 遺伝子検出を個別に行う場合には別途、弊社製品「ノロウイルス G1 検出試薬キット（P/N：241-08905-91）」または「ノロウイルス G2 検出試薬キット（P/N：241-08905-92）」を使用してください。
・本試薬キットに含まれる RT Enzyme には Invitrogen 製『M-MLV Reverse Transcriptase』、PCR Enzyme には Bioline 製『BIOTAQ™ HS DNA Polymerase』を採用しています。
・本試薬キットによるノロウイルス G1 および G2 の検出限界**は当社規定条件にてどちらもおよそ** 50 copies/reaction です。
・この製品は（株）ビー・エム・エルからの特許第4437525号、第4414648号の特許ライセンス許諾に基づいて製造・販売しています。本製品の購入者による本製品の使用（商業目的を含む）については、上記許諾範囲において問題ありません。

技術的な内容に関するお問合せ窓口

株式会社島津製作所 分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット
http://www.shimadzu-biotech.jp TEL：075-823-1351 FAX：075-823-1364

特長

■ 1 回の反応でノロウイルス G1 および G2 を同時に検出することができます。
■ 1 本のチューブで糞便検体処理から RT-PCR までのトータルな操作ができます。
■ 糞便検体に処理試薬を加えて加熱するだけで直接、Reverse Transcription（RT）-PCR ができます。
■ 本試薬キットには偽陰性対策として内部コントロール DNA（I.C.）が含まれています。

使いかた

使用上の注意

・本試薬キット付属の酵素は使用時以外できるだけ冷凍（-20℃）保存してください。それ以外の各試薬は室温にて解凍後、転倒混和または vortex 等でしっかり混和してスピンダウン後、使用時までできるだけ氷冷下で保存してください。またすべての試薬は使用後、すみやかに冷凍（-20℃）に戻してください。
・操作中にチューブ内で液が飛び散った場合は、スピンダウンしてから使用してください。

1 試薬（5 本）を確認する

No.	試薬名称	キャップ	容量
①	Sample Treatment Reagent	透明	1 mL × 1 tube
②	RT Reagent	白	1.25 mL × 1 tube
③	RT Enzyme	紫	12.5 μL × 1 tube
④	PCR Reagent	白チップ、ループ付	240 μL × 1 tube
⑤	PCR Enzyme	紫チップ、ループ付	12.5 μL × 1 tube

2 検出方法に合わせて、必要品を準備する

※本試薬キット以外に次のものをご準備ください。

Ⅰ 電気泳動検出

電気泳動により特異的増幅産物のバンド長を検出します。

	品目	数量
Ⅰ用	1）PCR 装置	1 台
Ⅰ用	2）電気泳動槽、アガロースゲル※および分子量マーカ	
一般用	3）反応チューブ（PCR 装置に合ったチューブ）	1 本 /1 検体
一般用	4）RT 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	5）PCR 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	6）小型微量遠心機	1 台
一般用	7）恒温装置（サーマルサイクラーでの代用も可）	1 台
一般用	8）氷（クラッシュアイス）および冷却用アルミブロック	
一般用	9）マイクロピペット	
一般用	10）フィルター付チップ	

※：特異産物が 85 bp（G1）および 101 bp（G2）と低分子なため、短い DNA フラグメントの分離に適したアガロースゲル（TaKaRa 製『NuSieve® 3:1 Agarose』（ゲル濃度：4%）など）のご使用をお勧めします。

Ⅱ 融解温度検出

SYBR® Green Ⅰ（励起波長：490 nm、蛍光波長：530 nm）を用いて融解温度を検出します。
PCR 後の反応チューブのふたを開けずに検出できるので、コンタミネーションの危険性を低減できます。

	品目	数量
Ⅱ用	1）リアルタイム PCR 装置	1 台
Ⅱ用	2）125 × SYBR® Green Ⅰ溶液※1, ※2	
Ⅱ用	3）15 ～ 25 μM ROX レファレンス色素※3, ※4	
一般用	4）反応チューブ（PCR 装置に合ったチューブ）	1 本 /1 検体
一般用	5）RT 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	6）PCR 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	7）小型微量遠心機	1 台
一般用	8）恒温装置（サーマルサイクラーでの代用も可）	1 台
一般用	9）氷（クラッシュアイス）および冷却用アルミブロック	
一般用	10）マイクロピペット	
一般用	11）フィルター付チップ	

※ 1：SYBR® Green Ⅰに関しては、Molecular Probes 社が特許を保有しています。SYBR® Green Ⅰは正当権利者より購入してください。
※ 2：弊社では、Invitrogen 製『SYBR® Green Ⅰ nucleic acid gel stain』（10,000 ×）を TE にて 80 倍希釈（125 ×）した溶液を使用しています。
※ 3：Applied Biosystems 製のリアルタイム PCR 装置など、ROX の必要な装置を使用の場合のみ用意してください。
※ 4：弊社では Invitrogen 製『ROX Reference Dye』を使用しています。

3 前処理する

1 糞便検体を生理食塩水または水に 5 ～ 10%（W/V）濃度で懸濁します。（0.1 mL ～ 1 mL 程度 /1 検体）

2 糞便懸濁液を遠心分離します。（3,000 ～ 10,000 rpm で 5 分間）

3 反応チューブに① Sample Treatment Reagent：19 μL と糞便遠心上清：1 μL を添加し、ピペッティングまたはタッピングでしっかり混合します。

4 恒温装置で 90℃、5 分の熱処理を行います。（Final 20 μL/tube）

5 氷冷します。

4 RT 反応液を調製し、RT 反応を行う

1 RT 反応液調製用チューブで RT 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします）

RT 反応液（1 反応分）

② RT Reagent：	24.75 µL
③ RT Enzyme：	0.25 µL
Total：	25 µL

2 前処理したサンプル：20 µL に、RT 反応液：25 µL を添加します。
ピペッティングなどでしっかり混合し、恒温装置で RT 反応を行います。（Final 45 µL/tube）

RT 反応温度条件

37℃、30 分 → 90℃、5 分 → 氷冷

反応液の調製はできるだけ
氷冷下で行ってください。

5 PCR で増幅し、検出する

⚠ 融解温度解析を行った後の PCR 産物を電気泳動すると、反応液中に含まれる SYBR® Green Ⅰの影響で泳動が遅くなり、産物サイズが実際より長く検出されます。

Ⅰ 電気泳動検出（G1とG2 の区別ができます）

1 PCR 反応液調製用チューブで PCR 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします）

PCR 反応液（1 反応分）

④ PCR Reagent：	4.75 µL
⑤ PCR Enzyme：	0.25 µL
Total：	5 µL

2 RT 反応後のチューブ：45 µL に、PCR 反応液：5 µL を添加し、PCR を行います。（Final 50 µL/tube）

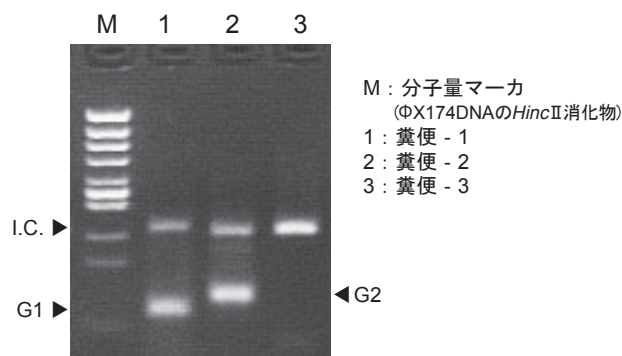
PCR 温度条件

95℃、10 分 → [95℃、15 秒 / 56℃、30 秒 / 72℃、45 秒] 45 サイクル → 72℃、1 分

3 電気泳動にて PCR 産物を確認し、判定します。

ノロウイルス ＼ I.C.		特異的増幅産物長：204 bp - 211 bp	
		○	×
G1 特異的増幅産物長： 85 bp G2 特異的増幅産物長：101 bp	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能※

※いずれのバンドも確認できない場合は、再実験を行います。RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を生理食塩水または水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】

アガロースゲル： TAE にて 4% 濃度にした TaKaRa 製『Nusieve® 3:1 Agarose』ゲル
ゲルへの産物添加量： 10 µL/ コーム
泳動条件： 100 V、25 分

判定結果

糞便 -1: ノロウイルス G1 陽性　　糞便 -3: ノロウイルス陰性
糞便 -2: ノロウイルス G2 陽性

Ⅱ 融解温度検出（G1とG2 の区別はできません）

1 PCR 反応液調製用チューブで PCR 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします）

PCR 反応液（1 反応分）

④ PCR Reagent：	4.75 µL
⑤ PCR Enzyme：	0.25 µL
125 × SYBR® Green Ⅰ溶液：	1 µL
15 ～ 25 µM ROX レファレンス色素：	1 µL （必要な場合のみ）
Total：	6 µL（ROX なし）、7 µL（ROX あり）

2 RT 反応後のチューブ:45 µL に、PCR 反応液:6 µL（ROX なし）または 7 µL（ROX あり）を添加し、PCR を行います。
（Final　ROX なし：51 µL/tube、ROX あり：52 µL/tube）

PCR 温度条件

95℃、10 分 → [95℃、15 秒 / 56℃、30 秒 / 72℃、45 秒] 45 サイクル → 72℃、1 分

3 融解温度解析を行い、判定します。

弊社では、Bio-Rad 社 MiniOpticon リアルタイム PCR システムを使用し、70℃から 95℃まで（0.5℃ /10 秒刻み）の融解温度解析データを取得しています。それ以外の装置を使用した場合には、弊社の結果と若干異なる場合がありますのでご了承ください。

ノロウイルス ＼ I.C.		ピーク検出温度：85.5℃± 1℃	
		○	×
ピーク検出温度：80.5℃± 2℃	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能※

※いずれのピークも確認できない場合は、再実験を行います。RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を生理食塩水または水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】

判定結果

糞便 -1: ノロウイルス G1 陽性　　糞便 -3: ノロウイルス陰性
糞便 -2: ノロウイルス G2 陽性